

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**SLEDOVÁNÍ STABILITY DERIVÁTU  
GLYCINU S NBDCI**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**OBSERVATION OF STABILITY OF  
GLYCINE-NBDCI DERIVATIVE**

**DIPLOMA THESIS**

Vedoucí diplomové práce: Ing. Vladimír Kubiček, CSc.

Hradec Králové, 2010

Tereza Uhlářová

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že diplomová práce je mým dílem a všechny zdroje v ní obsažené jsou řádně citovány a uvedeny v použité literatuře.

.....

datum

.....

podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při jejím vypracování.

Zároveň bych chtěla poděkovat svým rodičům a přátelům, kteří mě během studia na vysoké škole podporovali.

# Obsah

<b>Souhrn</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>1. Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2. Teoretická část</b>	<b>10</b>
2. 1. Vliv glycinu na bolest	11
2. 2. Využití 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu (NBD-Cl) jako derivatizačního a fluorescenčního činidla pro důkaz a stanovení aminokyselin a aminů	12
2. 3. Mechanismus derivatizační reakce	13
2. 4. Chromatografické metody a jejich dělení	15
2. 5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	16
<b>3. Experimentální část</b>	<b>19</b>
3. 1. Chemikálie	20
3. 2. Použité přístroje	20
3. 3. Podmínky chromatografické analýzy	21
3. 4. Podmínky detekce	21
3. 5. Použité roztoky	21
3. 6. Uchovávání a měření vzorků	22
<b>4. Výsledky</b>	<b>24</b>
4. 1. Kalibrace	25
4. 2. Vlastní měření stability studovaného derivátu	26
4. 2. 1. <i>Zkoušené vzorky uchovávané na denním světle za laboratorní teploty</i>	26

4. 2. 2. <i>Zkoušené vzorky uchovávané ve tmě za laboratorní teploty</i>	31
4. 2. 3. <i>Zkoušené vzorky uchovávané ve tmě v chladicím boxu</i>	36
<b>5. Diskuse</b>	<b>43</b>
<b>6. Závěr</b>	<b>47</b>
<b>Použitá literatura</b>	<b>49</b>

## Souhrn

Předmětem této diplomové práce bylo sledování stability derivátu glycinu s fluorescenčním derivatizačním činidlem 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem (NBD-Cl) za různých podmínek po dobu přibližně dvou měsíců.

Z výsledků této práce vyplývá, že vzorky uchovávané při laboratorní teplotě podléhaly výrazným změnám v koncentraci samotného derivátu i vedlejšího produktu. Vliv světla je možné při laboratorní teplotě označit za méně významný. Za chladu (2 °C) a ve tmě dochází ke značně pomalejším změnám koncentrace derivátu glycinu s NBD-Cl i vedlejšího produktu než při uchovávání za laboratorní teploty. Ze všech provedených pokusů lze soudit, že i při uchovávání vzorků za chladu a temna je nutná jejich chemická stabilizace.

## **Abstract**

The aim of this diploma thesis is monitoring of the chemical stability of derivative formed by glycine and fluorescent derivative, actually 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl), under various conditions during approximately two months.

As the obtained results show, the samples stored at laboratory temperature exhibit marked changes of concentrations of both the derivative itself and a by-product. An influence of light seems to be less important at the laboratory temperature. For the samples stored cooled (2 °C) in dark the changes in both concentrations were observed to be significantly diminished compared to the samples stored at the laboratory temperature. Based on the all performed experiments the conclusion is that regardless of the storage conditions the chemical stabilization of the samples is necessary.

# **1. Úvod**



Předpokládá se, že glycin je neurotransmitter, který inhibuje bolest a působí v některých specifických mozkových oblastech, například v míše, v předních talamických jádrech a periaquedukální šedi. Na katedře farmakologie 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze jsou za účelem studia mechanismů bolesti prováděny biologické experimenty, při kterých je nutné zjišťovat koncentrace glycinu v biologickém materiálu.<sup>1)</sup> Při tom dochází k odběru vzorků tohoto materiálu po určitou dobu, většinou několika dní. Během této doby je třeba dříve odebrané vzorky uchovávat před jejich závěrečnou chromatografickou analýzou. Někdy dochází k uchovávání těchto vzorků i po dobu týdnů. Chromatografická metoda vyvinutá pro stanovení glycinu na uvedeném pracovišti používá fluorescenční detekci po předchozí derivatizaci glycinu pomocí 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu (NBD-Cl). Derivatizace se provádí ihned po odběru vzorku. Proto bylo v rámci spolupráce s katedrou farmakologie 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze prováděno sledování stability derivátu glycinu s NBD-Cl, aby se zjistilo, jak dlouho, případně zda vůbec je možné derivatizované vzorky skladovat bez vlivu na správnost stanovovaných koncentrací glycinu.

Tato diplomová práce se zabývá sledováním stability derivátu glycinu s NBD-Cl za různých podmínek, které přicházejí v úvahu při skladování výše uvedených vzorků. Zadavatelem bylo vyloučeno skladování zamražených vzorků, proto byla stabilita sledována za následujících třech podmínek:

1. Vzorky byly uchovávány na běžném denním světle při laboratorní teplotě.
2. Vzorky byly uchovávány ve tmě při laboratorní teplotě.
3. Vzorky byly uchovávány ve tmě v chladicím boxu (2 °C).

Poslední možnost, uchovávání vzorků v chladicím boxu za světla, byla zavržena ze dvou důvodů. Prvním je mizivá pravděpodobnost takového skladování, druhým jsou technické potíže při realizaci příslušného pokusu.

## **2. Teoretická část**

## 2. 1. Vliv glycinu na bolest

Bolestí se rozumí široký pojem vjemů velmi rozdílného charakteru. Intenzita těchto vjemů se nachází mezi pocity nepříjemnými až k pocitům nesnesitelným.

Bolestivé podněty jsou přijímány volnými nervovými zakončeními (receptory, senzory) a jsou vedeny do zadních míšních kořenů buď vlákny nemyelinizovanými (vlákna C), nebo vlákny myelinizovanými (vlákna A $\delta$ ). Kterým vláknem bolestivý podnět půjde, záleží na tom, co jej vyvolalo. Pokud volné zakončení vláken bylo podrážděno silným tlakem nebo horkem, bude bolest vedena vlákny A $\delta$ , naproti tomu nervová zakončení vláken C přijímají chemické podněty vznikající v poraněných tkáních. Ať už bolest vyvolal jakýkoliv podnět, prostřednictvím prostaglandinů dochází k jeho zesílení.<sup>2)</sup>

V zadních rozích míšních dochází pomocí neurotransmiterů k přenosu a modulaci bolestivých podnětů z periférie na druhý neuron dráhy bolesti. Mezi neurotransmitery, které se na přenosu podílejí, patří excitační aminokyseliny (glutamát, aspartát) a neuropeptidy (substance P, neuropeptid Y, ...), na modulaci se podílejí opiodní, GABA-ergní, serotoninergní, adrenergní, adenosinergní a cholinergní systémy.<sup>3)</sup>

Na postsynaptické membráně zadních míšních kořenů se kromě jiných nacházejí tyto typy receptorů pro glutamát – NMDA (N-methyl-D-aspartát), AMPA (amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionová kyselina). AMPA receptory se více podílejí na přenosu akutní bolesti, kdežto NMDA receptory hrají hlavní roli u chronické bolesti. Po aktivaci NMDA receptoru dochází ke zvýšené produkci oxidu dusnatého, prostaglandinů a otevření kalciových kanálů. Zvýšená hladina intracelulárního kalcia mimo jiné aktivuje fosfolipázu A<sub>2</sub>, která odštěpuje arachidonovou kyselinu z fosfolipidové membrány. Z kyseliny arachidonové vznikají působením klíčového enzymu cyklooxygenázy (COX), která se vyskytuje ve dvou izoformách COX-1 a COX-2, kromě jiných látek také prostaglandiny (PG).<sup>3)</sup>

Prostaglandiny (zvláště PGE<sub>2</sub>) přes své receptory zesilují přenos bolestivého impulsu několika mechanismy, mezi které patří mimo jiné i inhibice glycinergní transmise. V míše se nacházejí obě formy COX. Na periférii je konstitutivně přítomna COX-1, zatímco aktivita COX-2 je vyvolána lokálním poškozením tkáně. Podle nejnovějších výzkumů má inhibice COX-2 na spinální úrovni dominantní podíl na

analgetickém účinku neopioidních analgetik. Dlouho se nevědělo, jakým přesným receptorovým/kanálovým mechanismem prostaglandiny působí centrální senzitivizaci v zadních rožích míšních. Nedávno bylo prokázáno, že prostaglandin E<sub>2</sub> narušuje inhibiční aktivitu glycinu, který se projevuje jako koagonista na excitačních NMDA receptorech. To znamená, že ačkoli se primárně v míše projevuje inhibiční funkce glycinu, při opakovaném periferním dráždění, například v podobě zánětu, je glycin uzpůsoben aktivovat NMDA receptory. To je jeden z možných procesů, kterými dochází k neurofarmakologické přeměně akutní bolesti v bolest chronickou.<sup>3)</sup>

## **2. 2. Využití 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu (NBD-Cl) jako derivatizačního a fluorescenčního činidla pro důkaz a stanovení aminokyselin a aminů**

Během zkoumání 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolových derivátů pro jejich potenciální antileukemickou aktivitu zjistili Gosh a Whitehouse<sup>4)</sup>, že některé 7-amino deriváty vykazují ve slabě polárním rozpouštědle a po excitaci viditelným světlem ( $\lambda = 464 \text{ nm}$ ) silnou fluorescenci v případě, že je aminoskupina odvozena od alifatických aminů. Využili tedy NBD-Cl jako fluorescenční činidlo pro důkaz a stanovení aminokyselin a peptidů. Zároveň se domnívali, že pro vysokou fluorescenci sloučenin je důležitá aminoskupina vázaná na tuto molekulu. Dále se ukázalo, že substituce aminoskupiny zkoušených látek brání konjugaci s NBD-Cl a dochází také ke ztrátě fluorescence. Na druhé straně vykazují fluorescenci i jiné sloučeniny, ale podmínkou je přítomnost elektrondonorové skupiny (např. -OR; -SR) v jejich molekule. Intenzita fluorescence u těchto sloučenin je ale mnohem nižší než v případě 7-amino derivátů. Mezi výhody derivatizačního činidla patří jeho vysoká chemická stabilita (např. vůči vlhkosti) a dobrá rozpustnost ve vodných roztocích. Tyto přednosti způsobují, že se NBD-Cl využívá pro důkaz a stanovení již velmi nízkých koncentrací primárních a sekundárních aminů a aminokyselin.

Zmíněnou reakci se 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem jako derivatizačního činidla použili El-Elman, Hansen, Moustafa, El-Ashry a El-Sherbiny ke kvantitativnímu stanovení lisinoprilu v lékových formách a v lidské plazmě pomocí absorpční spektrofotometrie a HPLC.<sup>5)</sup>

Nevýhodou tohoto derivatizačního postupu je vznik vedlejšího fluoreskujícího produktu, hydrolyzovaného NBD-Cl, který je v dalším textu označován NBD-OH. Tuto látku je nutno chromatograficky oddělit od derivátu vlastního analytu.<sup>6), 7)</sup>

## 2. 3. Mechanismus derivatizační reakce

Derivatizační reakce glycinu s NBD-Cl patří mezi nukleofilní aromatické substituce. Při reakci je na aromatickém jádru nahrazována skupina i s vazebným elektronovým párem jinou skupinou – nukleofilním činidlem.<sup>8)</sup> Činidlem bývá malá molekula s volným elektronovým párem. Díky tomu má schopnost interagovat s molekulou, která má v některé své části nedostatek elektronů. Substrát obsahuje skupiny, které polarizací vazby vytvářejí vhodné podmínky pro nukleofilní atak. Odstupující skupina je vždy skupina s menší bazicitou než činidlo. Nukleofilní aromatické substituce nepatří mezi příliš běžné reakce aromátů z důvodu jejich značné stability. Proto tyto reakce u nich probíhají obtížněji a za drsnějších podmínek.

Je-li však nahrazovaná skupina aktivována substituenty s –I a –M efekty, probíhají aromatické nukleofilní substituce překvapivě snadno. Velmi také záleží na povaze nahrazované skupiny.<sup>9)</sup>

V případě derivatizačního činidla NBD-Cl je nahrazovanou skupinou halogen – chlór, který jde nahradit velmi snadno, protože je aktivován přítomnou nitroskupinou žádoucími zápornými efekty.

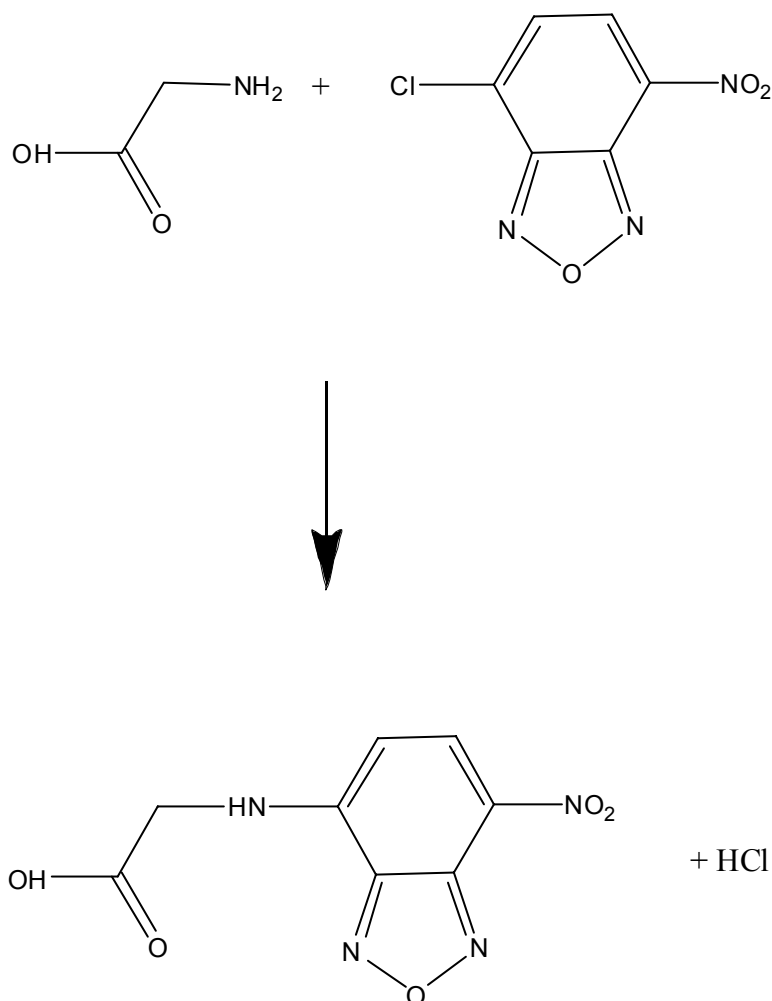
Nukleofilní substituce se dělí na monomolekulární nebo bimolekulární. Záleží na tom, kolik molekul se účastní přechodového (tranzitního) stavu. U monomolekulárních reakcí vzniká reaktivní meziprodukt z jediné molekuly (vzniká karbokation), u bimolekulárních reakcí se tranzitního stavu účastní obě reagující molekuly (nevzniká karbokation). Podle elementárních reakčních stupňů, přes které se tato přeměna uskutečňuje, se nukleofilní aromatické substituce dělí na tři typy.<sup>8)</sup> Nukleofilní aromatické substituce monomolekulární, nukleofilní aromatické substituce bimolekulární s mechanismem adičně-eliminačním a nukleofilní aromatické substituce s mechanismem eliminačně-adičním.<sup>9)</sup>

Mechanismus derivatizační reakce glycinu s NBD-Cl se řadí mezi nukleofilní aromatické substituce bimolekulární s mechanismem adičně-eliminačním. Molekula

NBD-Cl vystupuje jako substrát, glycin jako nukleofilní činidlo a Cl<sup>-</sup> jako odstupující skupina. Uhlík, který nese substituovanou skupinu, přechází působením nukleofilního ataku z planární hybridizace sp<sup>2</sup> na tetraedrickou hybridizaci sp<sup>3</sup>. Tím se dočasně ruší dokonalá konjugace aromatického jádra a elektrony jsou proto hlavně koncentrovány do poloh ortho a para. Vzhledem k tomu, že v poloze para je u NBD-Cl přítomna nitroskupina, přebytek elektronů je odváděn a atak nukleofilního činidla se usnadní a urychlí. Díky desaktivační nitroskupině klesá energetická náročnost reakce<sup>9)</sup>. Celková reakce u nukleofilní aromatické substituce je dvoustupňová. Významný vliv na rychlost prvního stupně má odstupující skupina, která svým polárním efektem sníží elektronovou hustotu na aromatickém uhlíku, na který je vázána. Čím bude toto snížení větší, tím ochotněji bude uhlík reagovat s nukleofilem a tím rychleji bude tento stupeň probíhat. Pro rychlost druhého stupně, tj. rozpadu intermediátu, je důležité množství energie, která je potřebná k polárnímu štěpení vazby mezi aromatickým uhlíkem a odstupující skupinou<sup>8)</sup>. Z toho vyplývá, že čím více sníží odstupující skupina elektronovou hustotu na aromatickém uhlíku, tím snadněji a rychleji bude nukleofil přistupovat na aromatické jádro v prvním stupni, avšak tím bude horší a těžší polární štěpení vazby mezi aromatickým uhlíkem a odstupující skupinou ve druhém stupni<sup>10)</sup>.

Reakční schéma derivatizace glycinu s NBD-Cl je uvedeno na obr. 1.

Obr. 1: Schéma derivatizační reakce glycinu s NBD-Cl



## 2. 4. Chromatografické metody a jejich dělení

Chromatografické metody patří mezi vysoce účinné separační metody, které slouží k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň také k jejich kvantitativní i kvalitativní analýze.<sup>11)</sup> Z těchto důvodů jsou chromatografické metody v analytické chemii značně využívány. Chromatografie spočívá v dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární – nepohyblivá (nazývá se sorbent) a druhá je mobilní – pohyblivá. Během chromatografického měření dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů analyzovaných látek mezi stacionární fází, která se nachází v koloně nebo na plošné vrstvě, a mobilní fází, která unáší separované látky. Na separaci látek mají vliv vzájemné interakce, ke kterým

dochází při styku stacionární a mobilní fáze s dělenými látkami. Z toho plyne, že k separaci dochází na základě různé afinity analyzovaných látek ke stacionární a mobilní fázi.<sup>12)</sup>

Chromatografické metody se dělí podle různých hledisek. Jednou z možností je dělení podle charakteru mobilní fáze. Pokud je mobilní fází inertní plyn, jedná se o plynovou chromatografii (GC), v případě kapalinové chromatografie (LC) je mobilní fází kapalina. Kapalinová chromatografie může být prováděna buď v plošném uspořádání (patří sem tenkovrstvá chromatografie – TLC a papírová chromatografie – PC), nebo v kolonovém uspořádání, kam řadíme v analytické chemii nejčastěji využívanou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC).<sup>13)</sup>

Jiné dělení chromatografických metod je podle podstaty separačního procesu. Patří sem: a) adsorpční chromatografie, jejíž separační podstatou je rozdílná adsorbovatelnost analyzovaných látek na aktivní povrch adsorbentu; b) rozdělovací chromatografie, kde je podstatou separace rozdílná rozpustnost dělených látek ve dvou vzájemně se nemísitelných kapalinách nebo rozdílná rozpustnost dělených látek unášených nosným plynem v kapalně stacionární fázi u plynové rozdělovací chromatografie; c) iontově výměnná chromatografie, která se provádí jen jako kapalinová chromatografie, podstatou separace je rozdílná afinita dělených látek, vyskytujících se obvykle v iontové formě, k iontovýměnným skupinám iontoměniče a stacionární fázi tvoří iontoměniče (katexy nebo anexy); d) gelová chromatografie, u níž jsou analyzované látky separovány na základě velikosti molekul, opět se jedná jen o kapalinovou chromatografii, molekuly látky jsou nesený mobilní fází, která protéká gelem naplněnou kolonou, a pronikají do rozpouštědlem naplněných gelových pórů; e) afinitní chromatografie má v analýze léčiv minimální využití.<sup>12)</sup>

## **2. 5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) je jednou z nejvíce používaných analytických metodik. Jedná se o separační metodu, která zároveň umožňuje kvalitativní i kvantitativní stanovení separovaných složek. K dalším přednostem HPLC patří rychlost analýzy, citlivost stanovení, minimální množství vzorku, možnost automatizace, kdy



nejmodernější chromatografy jsou vybaveny automatickými dávkovači a mohou tedy po vhodném nastavení provádět měření bez obsluhy operátora.

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníků mobilní fáze; vysokotlakého čerpadla, které tlačí konstantní průtokovou rychlostí mobilní fázi přes kolonu do detektoru; programovací jednotky, pomocí níž se nastavuje složení mobilní fáze; dávkovacího zařízení, které umožňuje dávkování roztoku vzorku; chromatografické kolony, v níž dochází k dělení směsi na jednotlivé složky, které jsou mobilní fází unášeny do detektoru; diferenciálního detektoru, který indukují průtok separované složky detekční celou a přenáší upravený signál do počítače.<sup>12)</sup>

Klasické kolony pro HPLC jsou vyrobeny z nerezové oceli nebo ze skla, bývají dlouhé 10 – 25 cm, vnitřní průměr mají 3 - 5 mm a jsou naplněny vhodnými sorbenty. V HPLC se nejvíce používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze, u kterých jsou na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrnků vázány různé radikály. Nejčastěji jsou vázány uhlovodíkové řetězce, které obsahují 18 (případně 8) uhlíkových atomů. Jedná se o nepolární chemicky vázané fáze (tzv. reverzní fáze). Nebo se jako radikál používá triuhlíkatý řetězec zakončený skupinami  $-NH_2$ ,  $-CN$ , pak se jedná o středně polární fáze. V praxi se většinou používá jako nosič stacionární fáze silikagel, na který jsou vhodnou chemickou reakcí navázány radikály. Méně často se v analytické chemii jako HPLC sorbenty používají polární sorbenty (samotný silikagel a oxid hlinitý).<sup>14)</sup> Stanovení pomocí HPLC lze provádět buď isokratickou elucí, kdy je konstantní složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, nebo gradientovou elucí, při které se v průběhu analýzy mění složení mobilní fáze. Mnohem častěji se v analýze léčiv využívá isokratické eluce.<sup>12)</sup>

Dávkování roztoku vzorku se provádí buď speciální injekční mikrostříkačkou, nebo dávkovacím kohoutem. V prvním případě se jehlou stříkačky propíchne septum ze speciální pryže a výhodou dávkování stříkačkou je možnost dávkovat různé objemy. Kohoutem se dávkuje pevně daný objem roztoku vzorku, což je nevýhoda, ale dávkování pomocí kohoutu je přesnější, než dávkování mikrostříkačkou. Moderní automatické dávkovače mají již možnost nastavení dávkovaného objemu v poměrně širokém rozmezí (desetiny  $\mu l$  až desítky  $\mu l$ )<sup>11)</sup>

Retenční (eluční) čas  $t_R$ , je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Eluční čas je základní kvalitativní charakteristikou v HPLC a zároveň shoda elučních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu je nejčastějším důkazem totožnosti.<sup>12)</sup> Plocha

chromatografického píku, případně u symetrických píků jejich výška, je kvantitativní charakteristikou v HPLC.<sup>11)</sup>

Citlivost a selektivita HPLC je závislá na použitém detektoru. Mezi nejčastěji používané patří: a) spektrofotometrické detektory, které se nejvíce uplatňují v analýze léčiv, proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu procházejícího detekční celou, nejpoužívanější jsou UV detektory; b) fluorimetrické detektory se využívají v případech, kdy léčivo (rozkladný produkt nebo metabolit) vykazuje fluorescenci, tyto detektory jsou citlivější a selektivnější než UV detektory; c) elektrochemické detektory využívají elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti léčiv; d) refraktometrické detektory měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem obsahujícím léčivo.<sup>12)</sup>

HPLC se v analýze léčiv využívá k identifikaci léčiv, stanovení obsahu a čistoty. Další uplatnění HPLC nachází při zjišťování stability léčiv, kdy se na chromatogramu vyskytuje jak hlavní pík analyzovaného vzorku, tak i menší píky rozkladných produktů. Výhodou HPLC v tomto případě je možnost kvantitativně hodnotit postupný úbytek sledovaného léčiva a zároveň kvalitativně i kvantitativně hodnotit vznikající rozkladné produkty. Další oblastí využití HPLC je v analýze přírodních léčiv v rostlinném materiálu. Poslední významné uplatnění v analytické chemii nachází HPLC v monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách.<sup>12)</sup>

### **3. Experimentální část**

### 3. 1. Chemikálie

dihydrofosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a. (Lachema Neratovice)  
kyselina fosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) p.a. (Lachema Neratovice)  
7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) (Fluka)  
acetonitril (ACN) chromasolv for HPLC, gradient grade (Sigma-Aldrich)  
kyselina boritá ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) (Sigma-Aldrich)  
glycin p.a. (gly) (Herbacos)  
deionizovaná voda (FaF)  
hydroxid sodný (NaOH)  
methanol p. a. (Penta)

### 3. 2. Použité přístroje

digitální analytické váhy (Sartorius)  
pH metr inoLab 720 (WTW) s kombinovanou pH elektrodou Theta typ 103  
ultratermostat U 15 (Prüfgeräte-Werk Medingen)  
ultrazvuková lázeň Sonorex RK 31 (Bandelin Electronics)  
chladicí skříň NS 600.3 VV (Frigera)  
HPLC analýzy jsem prováděla na kapalinovém chromatografu tvořeném vysokotlakým čerpadlem LC 10 ADVP, degaserem DGU-20 A5, fluorescenčním detektorem RF 10 AXL (vše Shimadzu).  
K nástřiku vzorků jsem používala nástřikový ventil Rheodyne s dávkovací smyčkou 20  $\mu\text{l}$  pomocí mikrodávkovače Hamilton 705 N.  
Mobilní fáze jsem filtrovala pomocí filtračního zařízení (Supelco) s použitím filtrů Nylon 66 0,45  $\mu\text{m}$  (Supelco).  
Sběr a zpracování dat jsem prováděla datastanicí CSW 1.7 (Data Apex).

### 3. 3. Podmínky chromatografické analýzy

kolona Discovery HS-C18 (Supelco)

mobilní fáze tvořená směsí fosfátového pufru o hodnotě pH 2,5 ( $c = 0,025 \text{ mol/l}$ ) a

ACN (75:25)

průtok jsem nastavila na 1,0 ml/min

### 3. 4. Podmínky detekce

$\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$

### 3. 5. Použité roztoky

zásobní roztok glycinu 1000  $\mu\text{mol/l}$

derivatizační roztok NBD-Cl o koncentraci 0,3%

fosfátový pufr pH = 2,5

borátový pufr pH = 9,0

#### 3. 5. 1. Příprava fosfátového pufru

Zásobní roztok fosfátového pufru jsem připravila rozpuštěním 3,4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  asi v 950 ml deionizované vody, pH roztoku jsem upravila pomocí koncentrované  $\text{H}_3\text{PO}_4$  na hodnotu 2,5 a doplnila jsem deionizovanou vodou v odměrné baňce na 1 litr a přefiltrovala jsem jej.

#### 3. 5. 2. Příprava borátového pufru

Zásobní roztok borátového pufru jsem připravila rozpuštěním 0,62 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  v deionizované vodě v odměrné baňce na 100 ml. Pomocí NaOH ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ ) jsem upravila na pH = 9,0 a přefiltrovala jsem jej.

### *3. 5. 3. Příprava derivatizačního roztoku NBD-Cl*

Derivatizační roztok jsem připravila smísením 75 mg NBD-Cl v methanolu v 25 ml odměrné baňce.

### *3. 5. 4. Příprava zásobního roztoku glycinu*

Zásobní roztok glycinu jsem připravila rozpuštěním 7,5 mg v deionizované vodě v odměrné baňce na 100 ml a roztok jsem přefiltrovala.

### *3. 5. 5. Příprava vzorků*

Vzorky jsem připravila smísením 500  $\mu$ l roztoku glycinu příslušné koncentrace (5, 10, 25  $\mu$ mol/l) s 500  $\mu$ l borátového pufru a 80  $\mu$ l 0,3% roztoku NBD-Cl. Promíchala jsem je 10 sekund v ultrazvukové lázni a za mírného protřepávání jsem je zahřívala 3 minuty v termostatu nastaveném na 60°C. Potom jsem vzorky vložila do ledové lázně, až došlo k ochlazení roztoku.

Tímto postupem jsem připravila tři paralelní vzorky na každé koncentrační hladině.

Stejným postupem jsem připravila i vzorky, které jsem použila na sestavení kalibrační křivky.

### *3. 5. 6. Příprava slepých vzorků*

Slepé vzorky jsem připravila stejným postupem jako zkoušené vzorky, ale místo roztoku glycinu jsem použila 500  $\mu$ l demineralizované vody.

## **3. 6. Uchovávání a měření vzorků**

Vzorky a slepé vzorky jsem rozdělila na 3 stejné skupiny. Každá skupina obsahovala 1 slepý vzorek a od každé koncentrace po jednom vzorku. Vzorky jsem uchovávala za různých podmínek. Jednu skupinu jsem uchovávala za temna v chladicí

skříní při cca 2 °C; druhou za denního světla a laboratorní teploty; třetí za temna a laboratorní teploty. Všechny vzorky byly uchovávány ve 2 ml vialkách se šroubovacími uzávěry uzavřenými septy. Pro vzorky skladované na světle byly zvoleny vialky z čirého skla, ostatní vzorky byly skladovány v hnědých vialkách, které byly navíc uzavřeny v alobalu. Tímto způsobem jsem vzorky delší dobu skladovala a průběžně jsem prováděla chromatografická stanovení koncentrace derivátu glycinu s NBD-Cl. V případě potřeby jsem vzorky ředila, aby se příslušné koncentrace pohybovaly v kalibračním rozsahu.

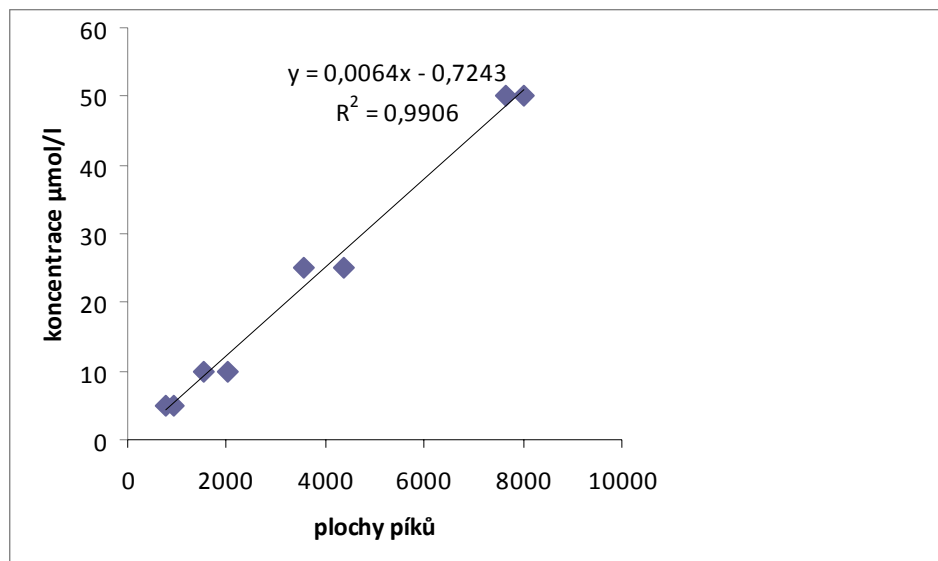
## **4. Výsledky**



## 4. 1. Kalibrace

Obr. 2 znázorňuje kalibrační křivku sestavenou pomocí připravených kalibračních vzorků.

Obr. 2: Kalibrační křivka.



## 4. 2. Vlastní měření stability studovaného derivátu

Na obr. 3 – 30 jsou znázorněny vzorové chromatogramy zkoušených vzorků uchovávaných za různých podmínek. Pík s retenčním časem kolem 9,5 min. je píkem sledovaného derivátu glycinu s derivatizačním činidlem (NBD-gly). Hydrolyzovanému derivatizačnímu činidlu (NBD-OH) patří pík s retenčním časem kolem 6 minut. Na většině chromatogramů se objevují další píky s retenčními časy přibližně 3,7; 4,0 a 11,3 minuty. Identita látek, jimž tyto píky náleží, není známá. Určité rozdíly v retenčních časech identických píků na jednotlivých chromatogramech jsou způsobeny tím, že start chromatogramu byl ovládán ručně zároveň s nástřikem. Dalším možným vlivem je patrně teplota, neboť chromatografická kolona nebyla termostatována.

### 4. 2. 1. Zkoušené vzorky uchovávané na denním světle za laboratorní teploty

Tab. 1: Naměřené koncentrace jednotlivých vzorků v  $\mu\text{mol/l}$  v závislosti na čase uchovávaných na denním světle za laboratorní teploty.

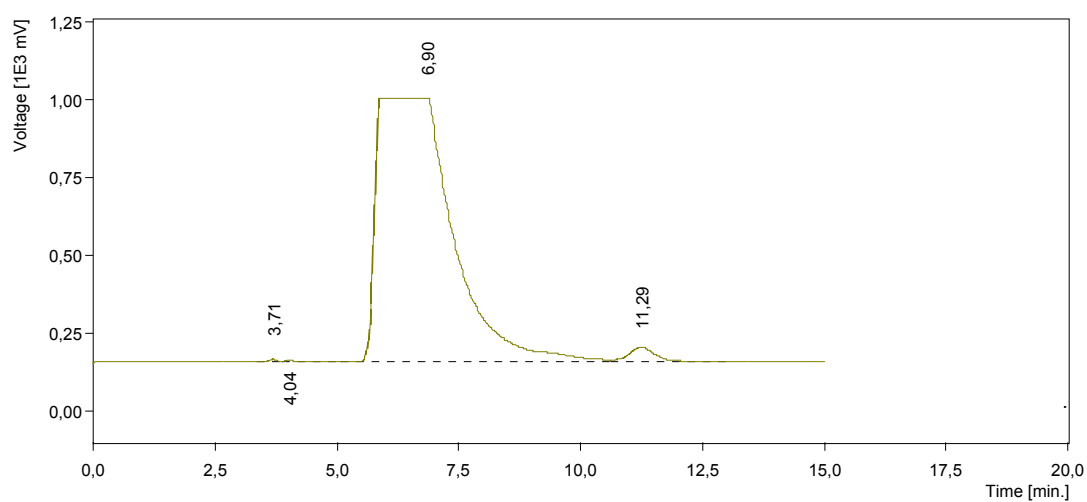
Den	původní koncentrace		
	5 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	25 $\mu\text{mol/l}$
0	1,8101	4,3765	11,6277
2	72,1845	132,3765	215,1093
7	76,9854	146,6046	238,4574
14	0	79,1879	62,163
21	0	0	0
28	0	0	0
42	0	0	0
56	0	0	0

Vzorky jsem od 7. dne po přípravě ředila podle potřeby v různých poměrech borátovým pufrům. Poměry ředění jsou uvedeny v tab. 2.

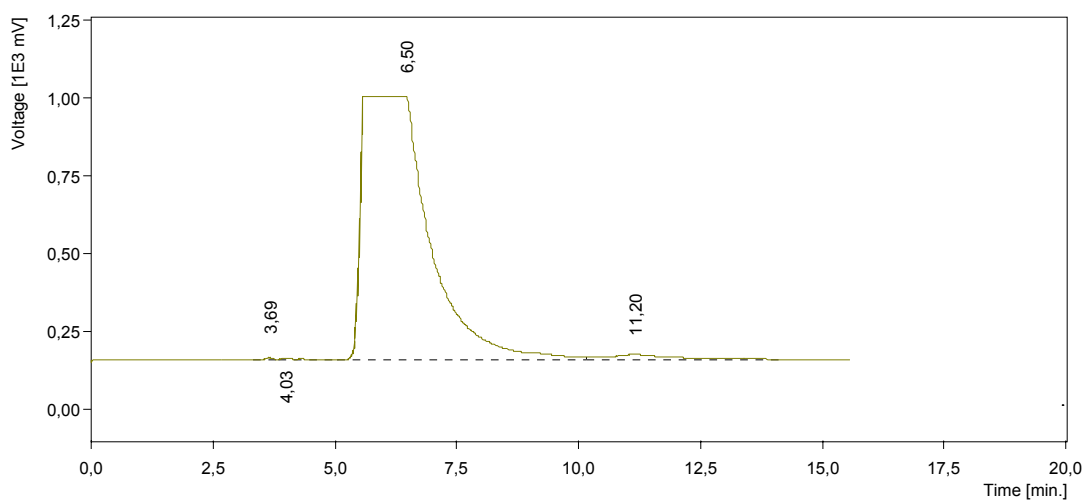
Tab. 2: Poměry ředění vzorku borátovým pufrům v příslušných dnech měření.

způsob uchovávání	vzorek : borátový pufr							
	dny měření							
	0	2	7	14	21	28	42	56
za laboratorní teploty na denním světle	-	-	1:5	1:10	1:8	1:5	1:5	1:5
za laboratorní teploty ve tmě	-	-	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
v chladicím boxu ve tmě	-	-	-	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5

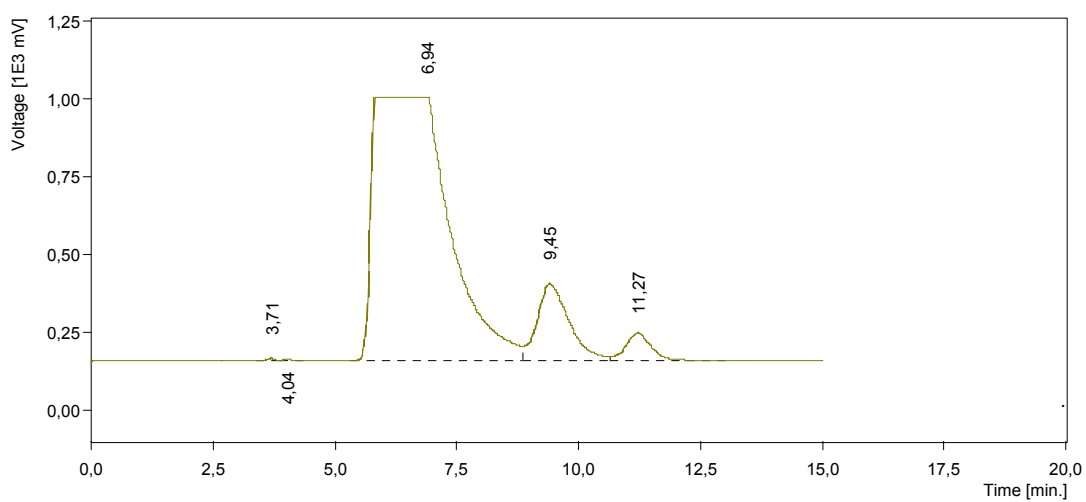
Obr. 3: Chromatogram slepého vzorku uchovávaného na denním světle za laboratorní teploty 2 dny po přípravě.



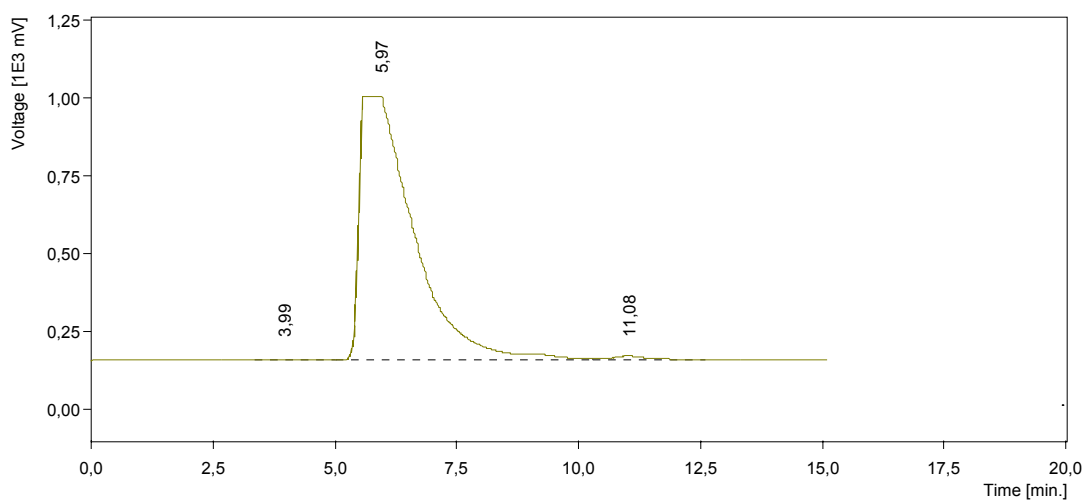
Obr. 4: Chromatogram slepého vzorku uchovávaného na denním světle za laboratorní teploty 42 dní po přípravě.



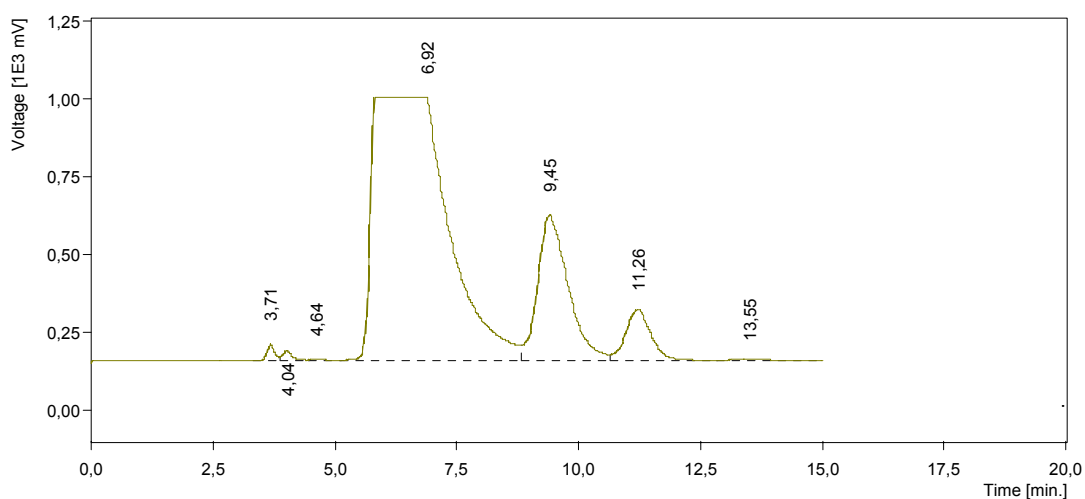
Obr. 5: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného na denním světle za laboratorní teploty 2 dny po přípravě.



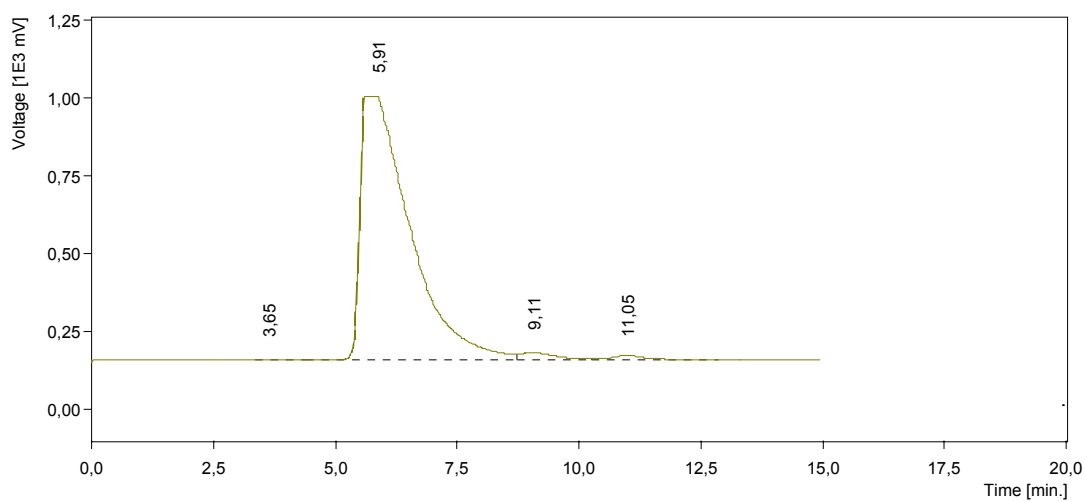
Obr. 6: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného na denním světle za laboratorní teploty 14 dní po přípravě.



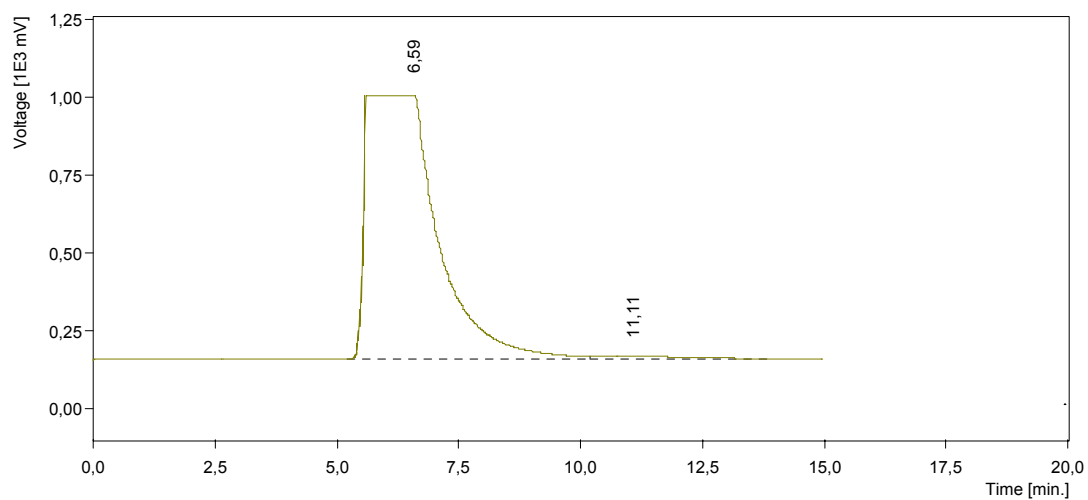
Obr. 7: Chromatogram vzorku o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného na denním světle za laboratorní teploty 2 dny po přípravě.



Obr. 8: Chromatogram vzorku o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného na denním světle za laboratorní teploty 14 dní po přípravě.



Obr. 9: Chromatogram vzorku o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného na denním světle za laboratorní teploty 42 dní po přípravě.



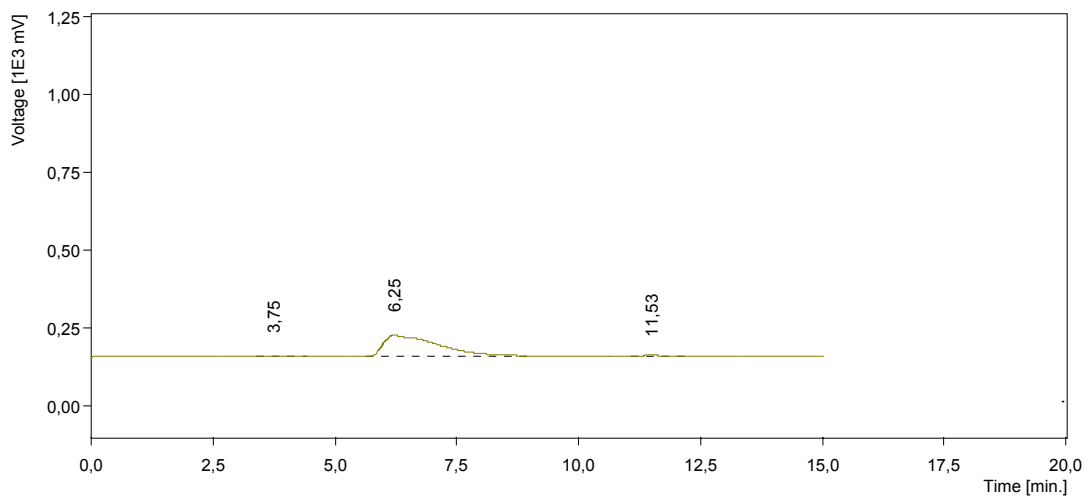
#### 4. 2. 2. Zkoušené vzorky uchovávané ve tmě za laboratorní teploty

Tab. 3: Naměřené koncentrace jednotlivých vzorků v  $\mu\text{mol/l}$  v závislosti na čase uchovávaných ve tmě za laboratorní teploty.

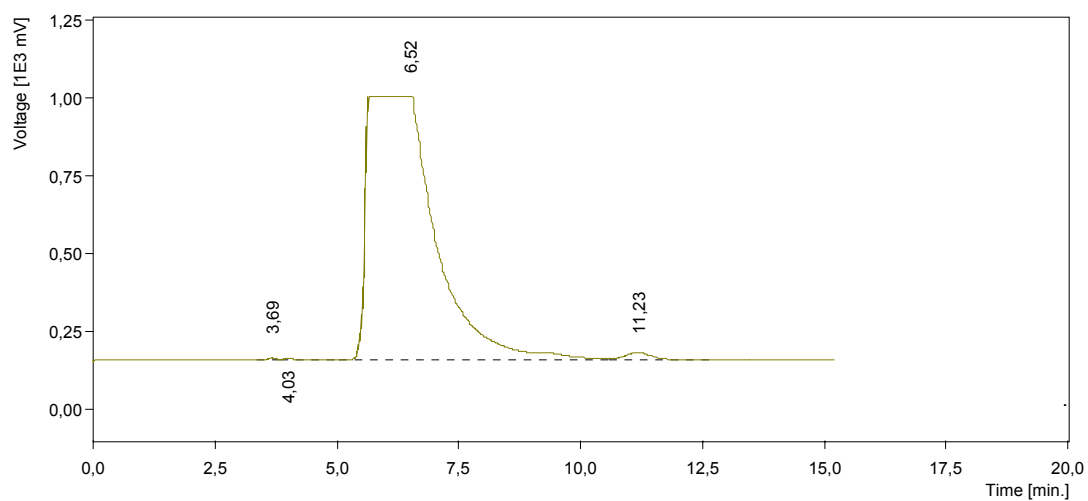
Den	původní koncentrace		
	5 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	25 $\mu\text{mol/l}$
0	5,2085	12,1909	27,2053
2	103,7429	188,8501	310,3477
7	157,8942	257,7726	508,755
14	131,5902	194,1438	329,1582
21	83,667	116,691	174,1758
28	0	0	114,387
42	0	0	0
56	0	0	0

Vzorky jsem od 7. dne po přípravě ředila podle potřeby v různých poměrech borátovým pufrům. Poměry ředění jsou uvedeny v tab. 2.

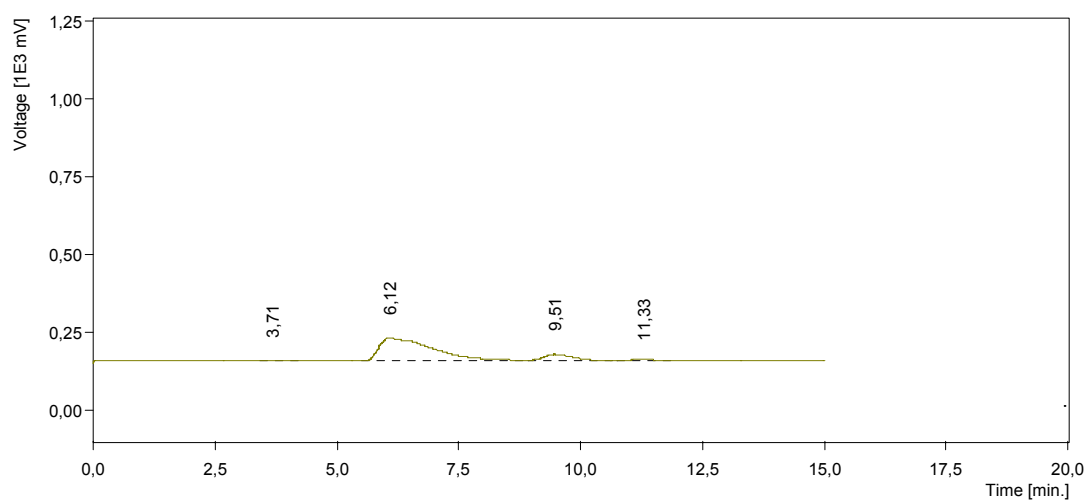
Obr. 10: Chromatogram slepého vzorku uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty v den přípravy.



Obr. 11: Chromatogram slepého vzorku uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty 7 dní po přípravě.

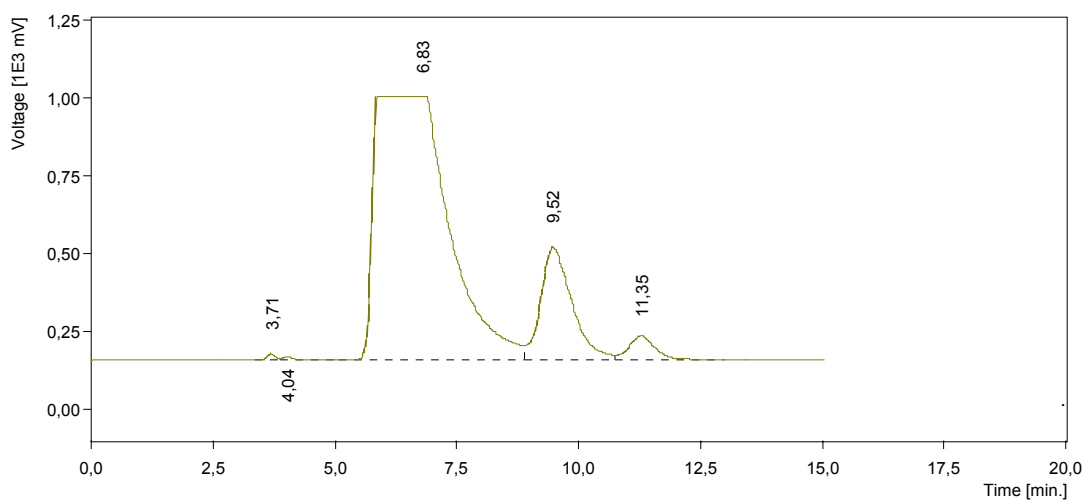


Obr. 12: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty v den přípravy.

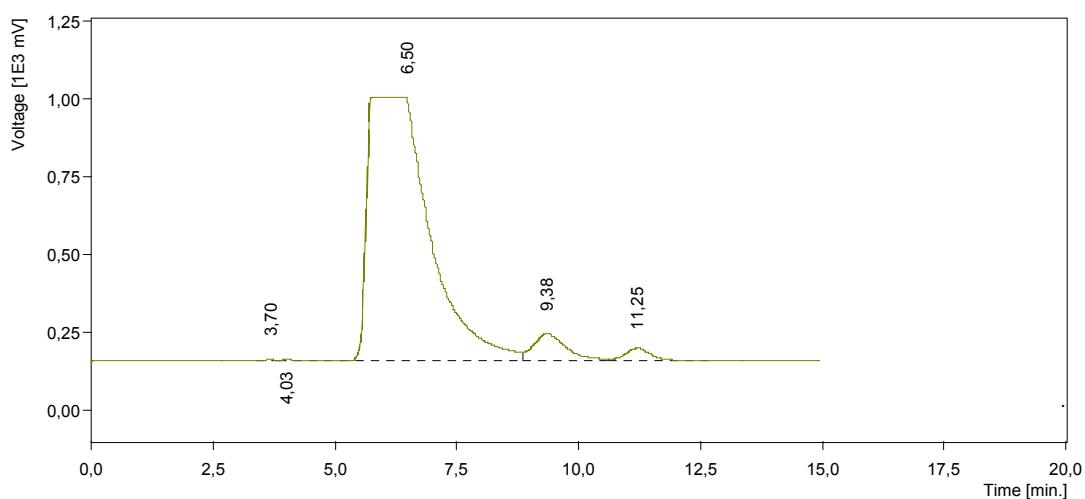




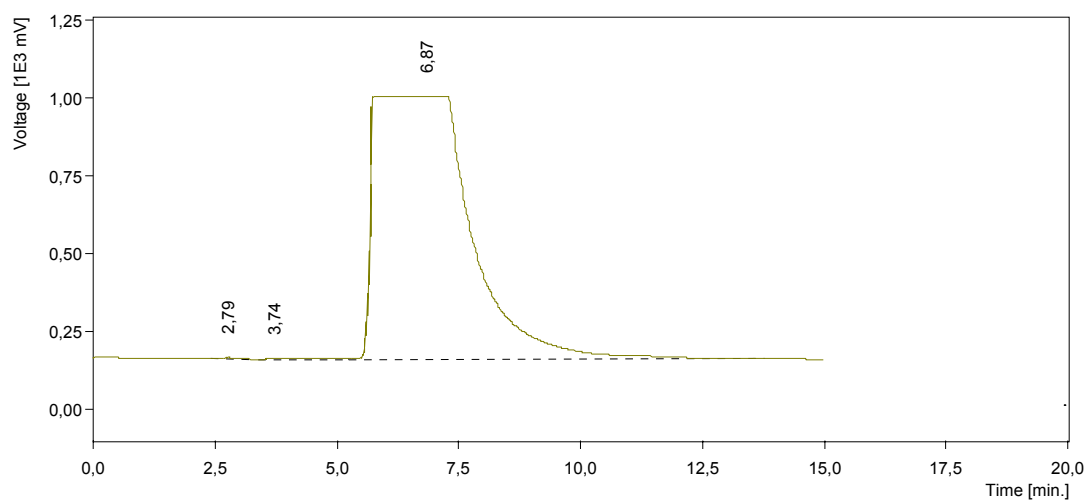
Obr. 13: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty 2 dny po přípravě.



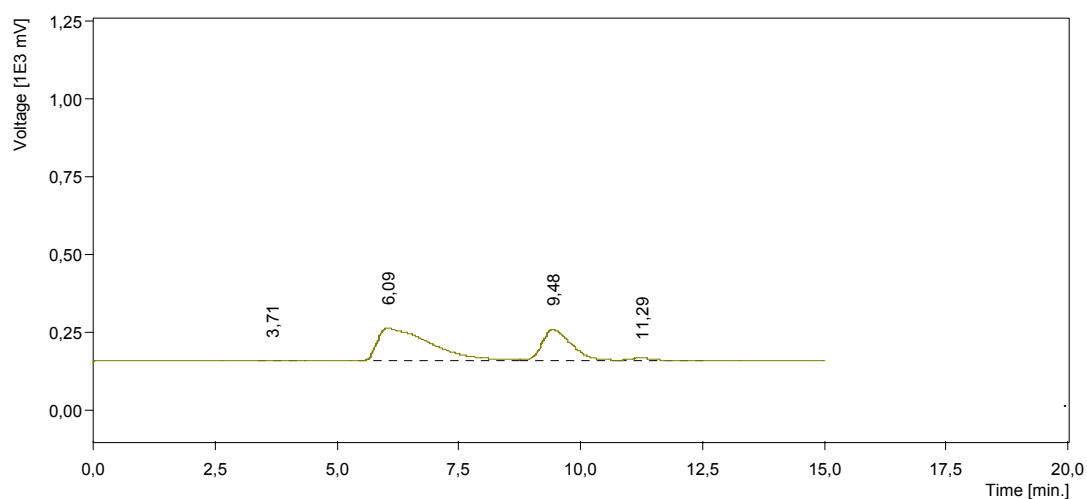
Obr. 14: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty 7 dní po přípravě.



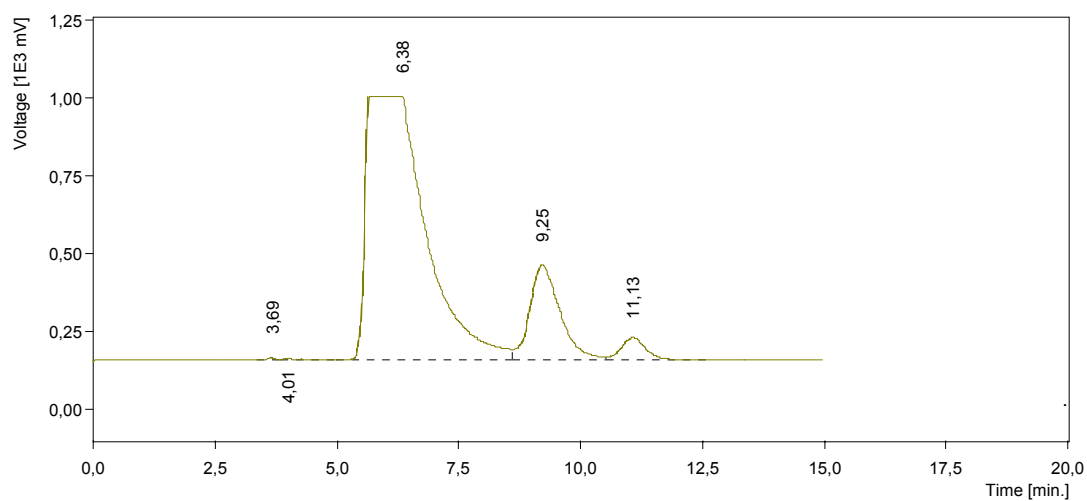
Obr. 15: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty 42 dní po přípravě.



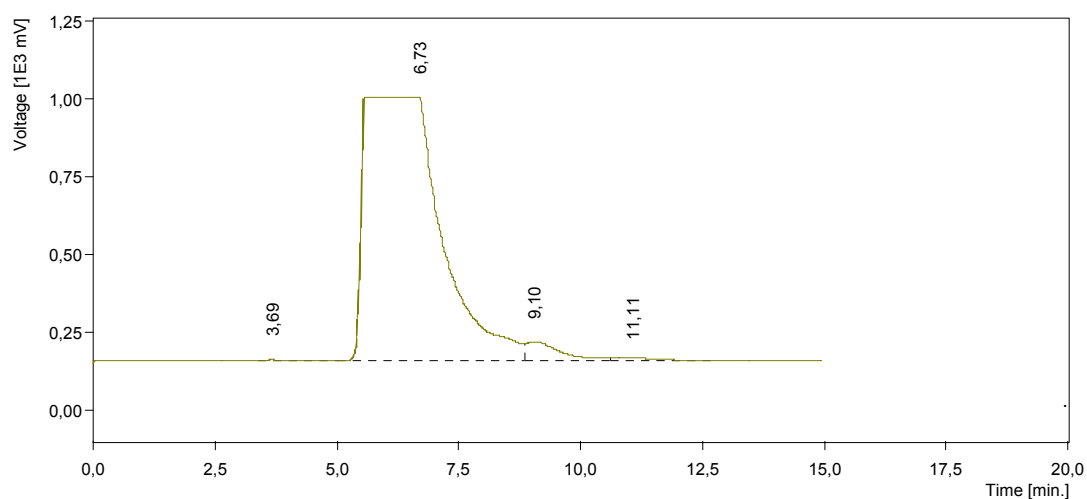
Obr. 16: Chromatogram vzorku o koncentraci 25  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty v den přípravy.



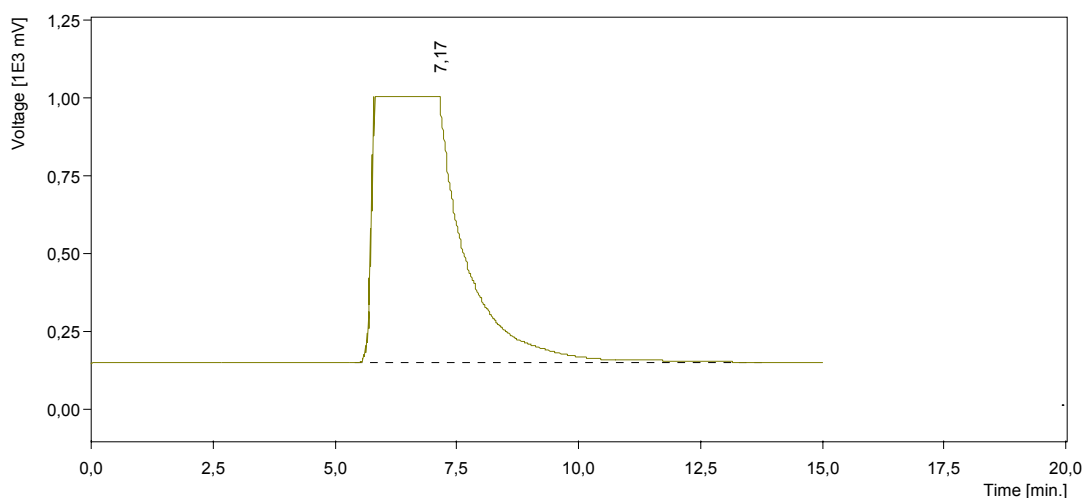
Obr. 17: Chromatogram vzorku o koncentraci 25  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty 7 dní po přípravě.



Obr. 18: Chromatogram vzorku o koncentraci 25  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty 28 dní po přípravě.



Obr. 19: Chromatogram vzorku o koncentraci 25  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě za laboratorní teploty 56 dní po přípravě.



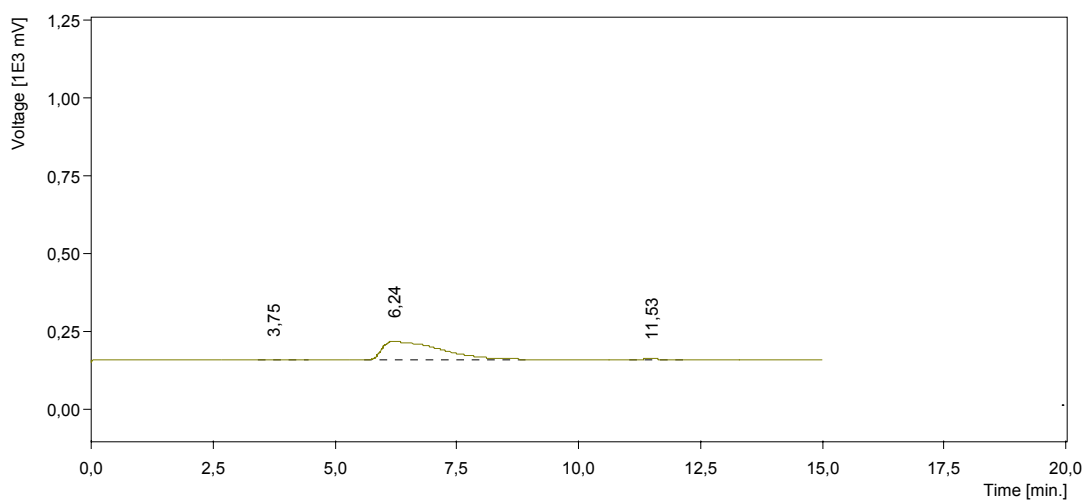
#### 4. 2. 3. Zkoušené vzorky uchovávané ve tmě v chladicím boxu

Tab. 4: Naměřené koncentrace jednotlivých vzorků v  $\mu\text{mol/l}$  v závislosti na čase uchovávaných ve tmě v chladicím boxu.

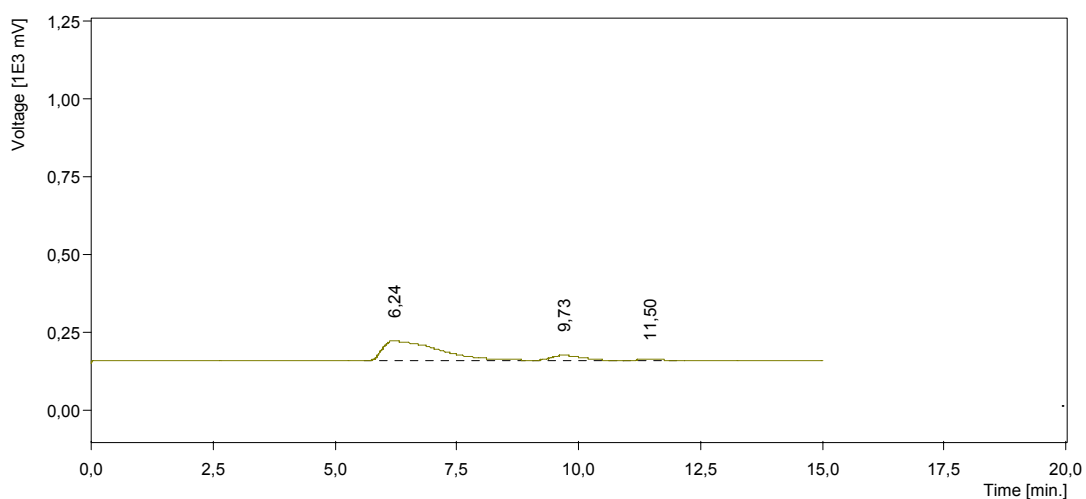
Den	původní koncentrace		
	5 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	25 $\mu\text{mol/l}$
0	4,2421	9,0421	22,0533
2	12,2357	23,7109	47,7109
7	29,7397	56,5237	109,2149
14	43,155	83,2062	171,603
21	55,1358	111,123	196,8702
28	87,4686	196,8318	330,0798
42	100,947	224,2494	422,6238
56	125,2926	285,4974	476,9214

Vzorky jsem od 14. dne po přípravě ředila podle potřeby v různých poměrech borátovým pufrům. Poměry ředění jsou uvedeny v tab. 2.

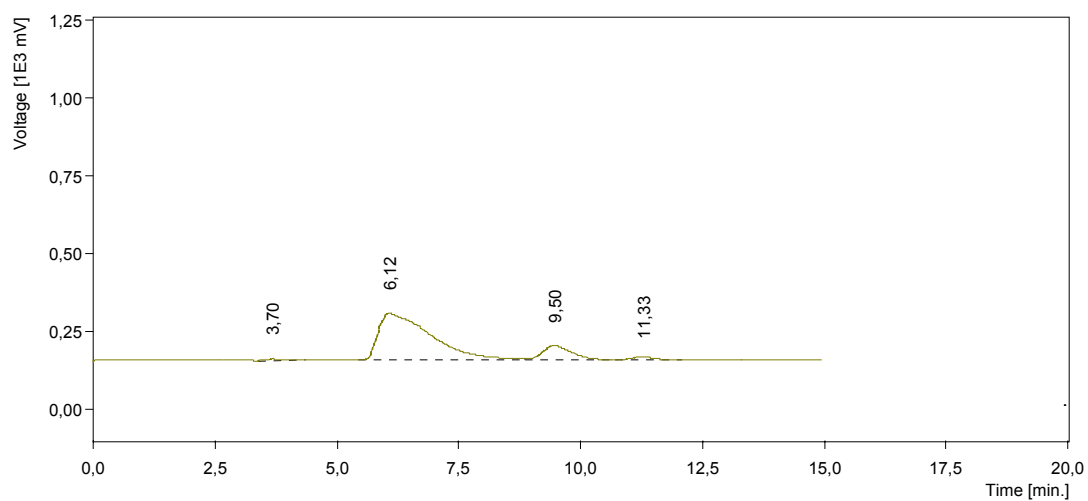
Obr. 20: Chromatogram slepého vzorku uchovávaného ve tmě v chladicím boxu v den přípravy.



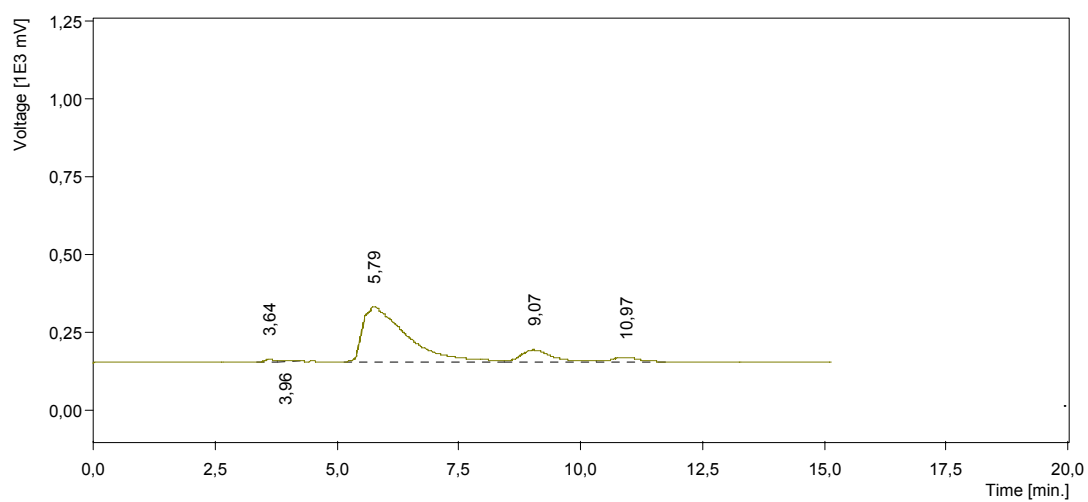
Obr. 21: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu v den přípravy.



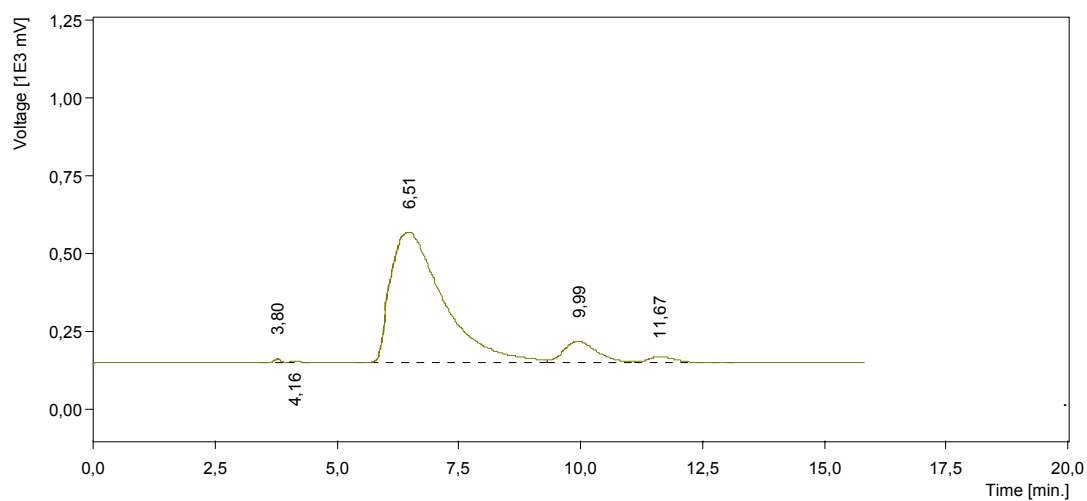
Obr. 22: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu 2 dny po přípravě.



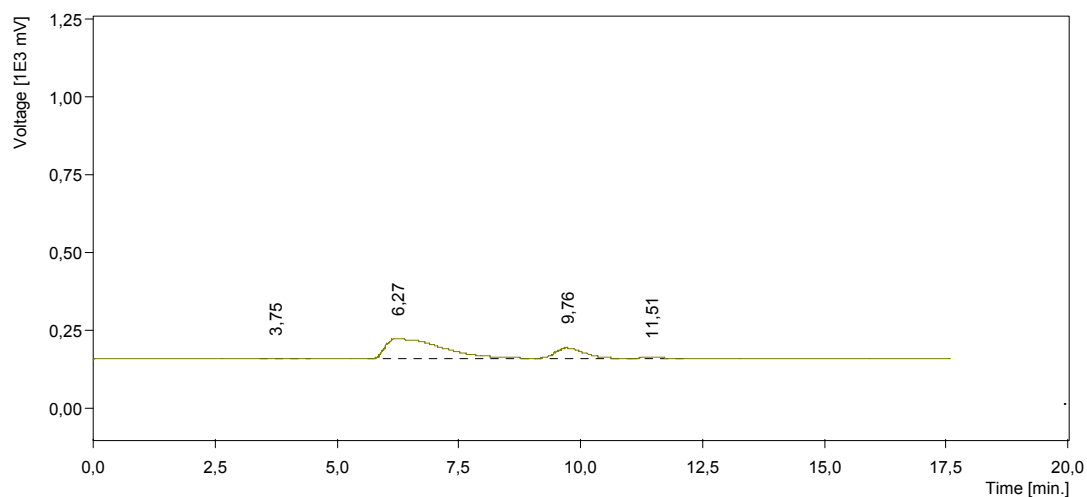
Obr. 23: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu 21 dní po přípravě.



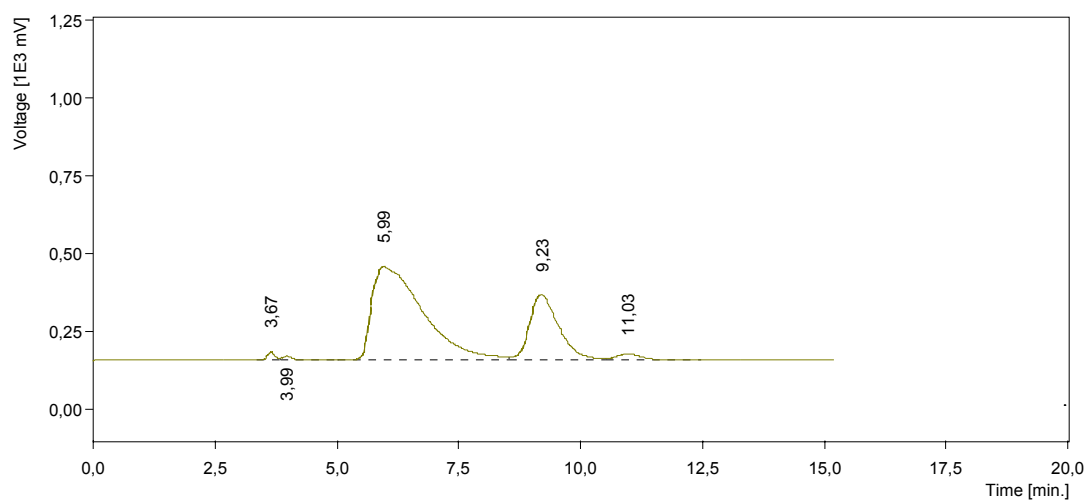
Obr. 24: Chromatogram vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu 56 dní po přípravě.



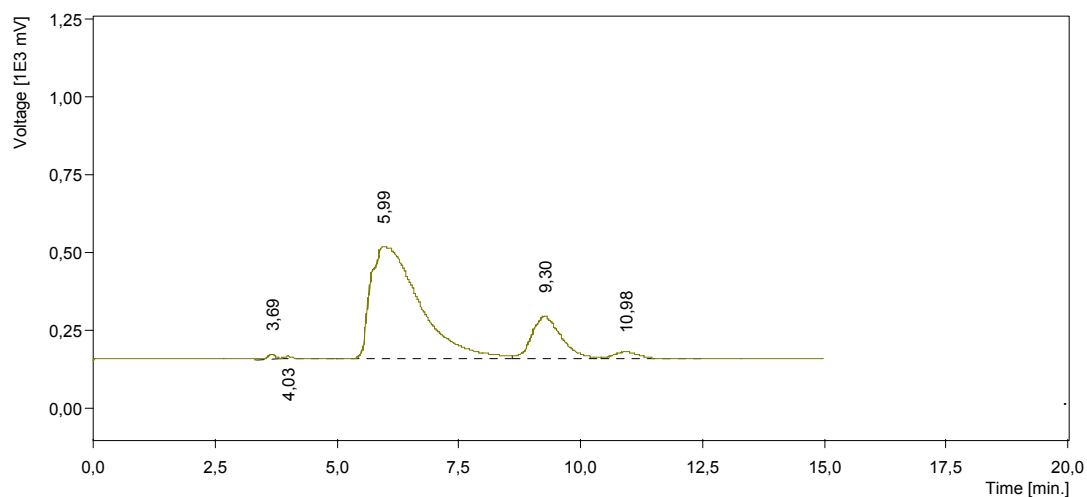
Obr. 25: Chromatogram vzorku o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu v den přípravy.



Obr. 26: Chromatogram vzorku o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu 7 dní po přípravě.

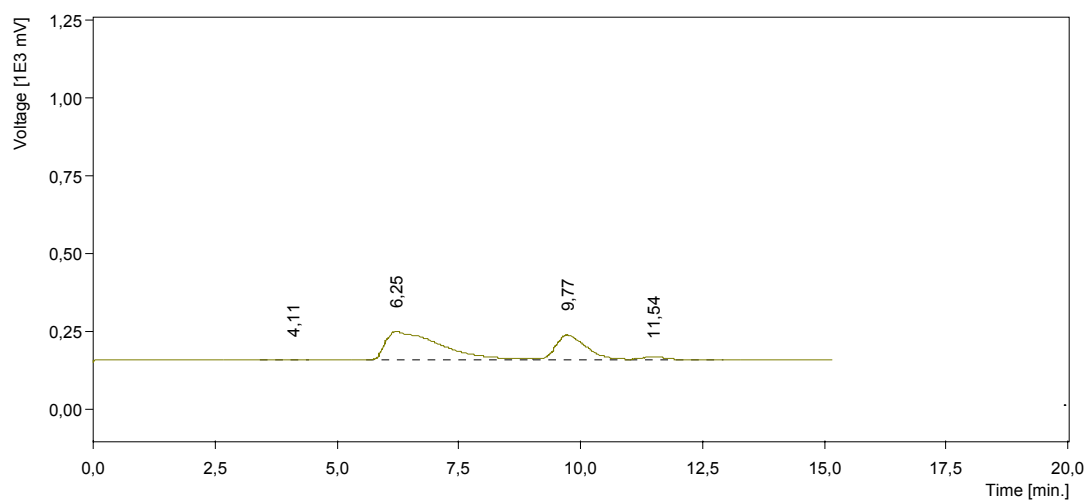


Obr. 27: Chromatogram vzorku o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu 42 dní po přípravě.

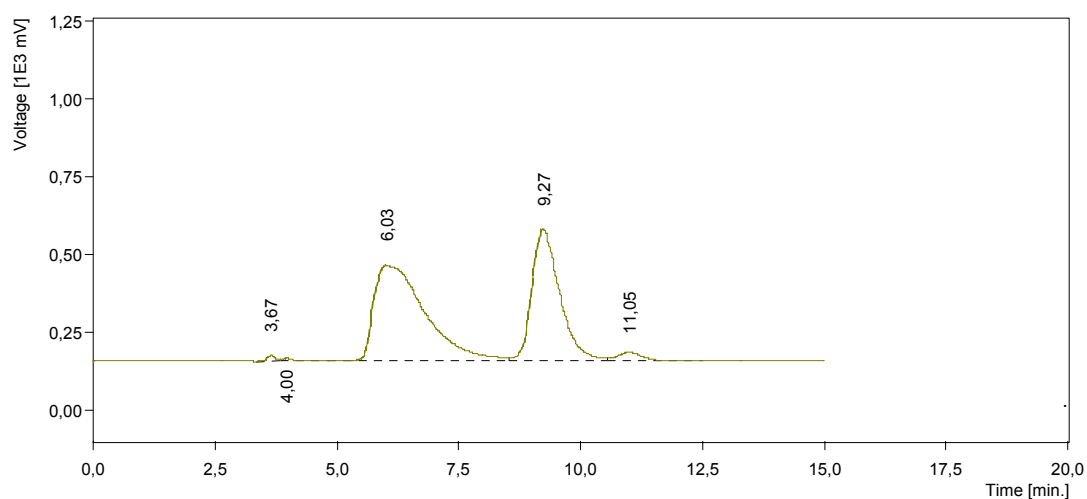




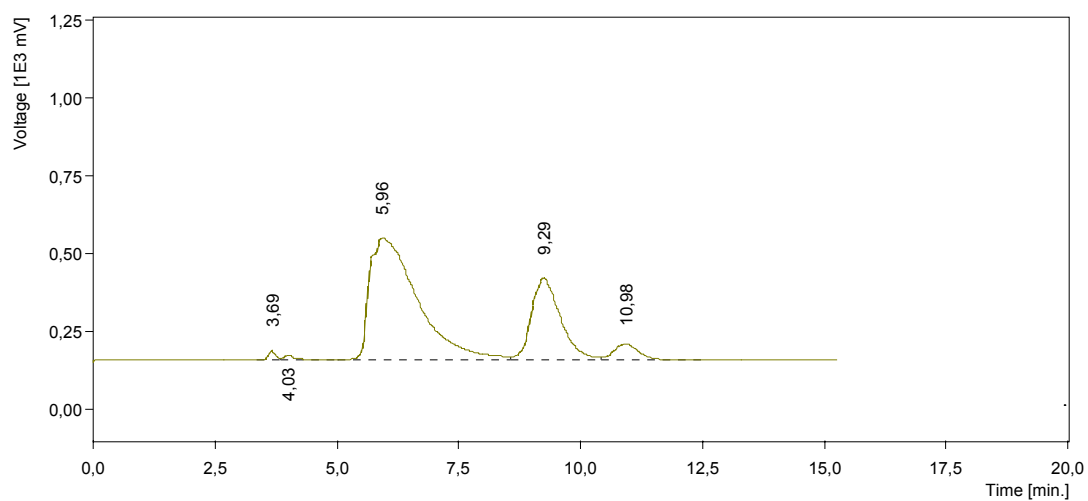
Obr. 28: Chromatogram vzorku o koncentraci 25  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu v den přípravy.



Obr. 29: Chromatogram vzorku o koncentraci 25  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu 7 dní po přípravě.



Obr. 30: Chromatogram vzorku o koncentraci 25  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného ve tmě v chladicím boxu 42 dní po přípravě.



## **5. Diskuse**

Obsahem této diplomové práce bylo sledování stability derivátu glycinu se 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu za různých podmínek.

Kalibrační křivka zobrazená na obr. 2 je sestrojena na čtyřech koncentračních hladinách, na každé z nich byla provedena dvě paralelní stanovení. Míru těsnosti dat, která je vyjádřena koeficientem determinace ( $r^2 = 0,9906$ ), lze označit za velmi dobrou.

Celé měření v trvání 56 dnů jsem prováděla dvakrát. První série měření byla orientační a během ní jsem zjistila, že při delším skladování vzrůstá koncentrace derivátu glycinu s NBD-Cl a také postupně roste koncentrace NBD-OH, který vzniká postupnou hydrolyzou derivatizačního činidla. Nárůst koncentrací obou těchto látek byl již po několika dnech sledování tak velký, že byl překročen dynamický rozsah detektoru. Z chromatogramů získaných během první série měření nebylo možné provést kvantitativní vyhodnocení, proto výsledky této série nejsou v diplomové práci uváděny. Při druhé sérii měření jsem po delší době uchovávání vzorky v případě potřeby ředila borátovým pufrům. Výsledky druhé série měření jsou obsahem kapitoly 4. 2. a jsou dále diskutovány.

V případě slepých vzorků uchovávaných za laboratorní teploty a za světla se v chromatogramech vyskytují vysoké a široké píky (obr. 3, 4), které překračují rozsah detektoru (signal over) i po následném ředění (obr. 4). Měřením slepých vzorků jsem ověřila, že v retenčním čase derivátu NBD-gly se nenachází žádný pík. Toto ověření je spíše součástí validace analytické metody, která měla být provedena na 3. Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze, ale při převodu již vyvinuté metody na jiné pracoviště je běžné, že se určité validační parametry znovu ověřují. Navíc měření slepých vzorků vypovídá o míře hydrolyzy derivatizačního činidla na NBD-OH.

Na chromatogramu vzorku o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  uchovávaného za laboratorní teploty a za denního světla měřeného 2 dny po přípravě nacházíme v příslušném retenčním čase pík derivátu NBD-gly. Koncentrace derivátu NBD-gly byla nízká, proto nebylo nutné vzorek ředit (obr. 5). Na rozdíl od dalších koncentrací, kdy se vzorky ředily, protože píky derivátu NBD-gly ležely na chvostu píku NBD-OH, v důsledku postupující hydrolyzy derivatizačního činidla. Ředěním vzorků mizí chvost, ale dochází tím také ke zmenšení píku derivátu NBD-gly, takže se už nedá spolehlivě odečíst jeho plocha (obr. 6). Zároveň je možné se domnívat, že derivát glycinu s NBD-Cl může za daných podmínek podléhat rozkladu.

Totožné výsledky jsem naměřila u koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  (obr. 7, 8, 9). Na obr. 9 zřetelně vidíme, že ředěním a také zřejmě dlouhodobým uchováváním (rozklad) se

ztrácí pík derivátu NBD-gly. Na obr. 7, kde je uveden chromatogram po 2 dnech od přípravy vzorku, je zcela zřetelně vidět pík příslušející NBD-gly, jehož plocha může být dostatečně správně stanovena. Na chromatogramu pořízeném 14 dní po přípravě vzorku (obr. 8) se již pík NBD-gly téměř ztrácí v chvostujícím píku NBD-OH a na chromatogramu měřeném po 42 dnech pík NBD-gly zcela zmizel.

Ke stejným výsledkům jako u předcházejících koncentrací jsem došla také u vzorku s 25  $\mu\text{mol/l}$  koncentrací. Údaje jsou patrné z tab. 1. Pokud nebylo možno nalézt pík NBD-gly na příslušném chromatogramu, jsou v tabulce uvedeny nuly.

Vzorové chromatogramy vzorků uchovávaných ve tmě za laboratorní teploty jsou na obr. 10 – 19. Na obr. 10 a 11 vidět nárůst koncentrace hydrolyzovaného derivatizačního činidla, který způsobuje již zmíněné problémy (vysoké a široké píky derivátu NBD-OH). Je velmi zajímavé, že slepý vzorek musel být už po týdnu uchovávání za laboratorní teploty a za tmy ředěn.

U koncentrace 5  $\mu\text{mol/l}$  je na obr. 12 jasně vidět zřetelně oddělené jednotlivé píky a malý pík NBD-OH. Ovšem, jak je patrné z obr. 13, dochází již po dvou dnech k prudkému nárůstu ploch píků NBD-OH a NBD-gly, proto se píky už musí při integraci dělit kolmicí, protože pík NBD-OH chvostuje, avšak chyba takto způsobená ještě nemusí být významná. Naproti tomu na obr. 14 vidíme, že pík NBD-gly je velmi malý (vzorek byl ředěn) a chyba je už v tomto případě kvůli dělení píků kolmicí značná. Na posledním chromatogramu z této koncentrace vidíme, že chvost píku NBD-OH je tak velký, že zcela pohltí pík sledovaného derivátu NBD-gly.

U koncentrací 10  $\mu\text{mol/l}$  a 25  $\mu\text{mol/l}$  jsou výsledky analogické s 5  $\mu\text{mol/l}$  koncentrací. Plochy píků NBD-gly jsou patrné z tab. 3 a u 25  $\mu\text{mol/l}$  koncentrace také z příslušných chromatogramů (obr. 16, 17, 18, 19).

Zajímavé je porovnání naměřených koncentrací v tab. 1 a tab. 3. V obou případech stoupají naměřené koncentrace sledovaných vzorků až do 7. dne po přípravě. Poté již nastal pokles těchto koncentrací. Při tom v případě vzorků uchovávaných ve tmě (tab. 3) jsou maximální koncentrace, tj. koncentrace po sedmi dnech, přibližně dvojnásobné oproti koncentracím zjištěným u vzorků uchovávaných na světle. To je možné vyložit rozkladným působením denního světla na NBD-gly.

Výsledky u vzorků uchovávaných v chladu a temnu jsou nejlepší. U slepých vzorků je koncentrace NBD-OH velmi nízká a v retenčním čase NBD-gly se nenachází žádný pík. Na obr. 20 je pro ilustraci uveden chromatogram slepého vzorku měřeného v den přípravy.

Na obr. 21-24 vidíme, že k hydrolýze derivatizačního činidla dochází mnohem pomaleji a i po 56 dnech od přípravy vzorků jsou na chromatogramu patrné zřetelné píky, na rozdíl od předešlých vzorků, které se uchovávaly za laboratorní teploty. Totéž je vidět u koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  a u koncentrace 25  $\mu\text{mol/l}$  (obr. 25-30). I zde je ovšem nutné konstatovat, že během skladování probíhá derivatizační reakce dále. Porovnáním údajů v tab. 3 a v tab. 4 je vidět, že pokračování této reakce je výrazně zpomaleno, což odpovídá známým zákonitostem o vlivu teploty na reakční rychlost.

Na základě uvedených výsledků se domnívám, že v reakční směsi probíhají během skladování dva protichůdné děje, pokračující derivatizace a následně naopak rozklad NBD-gly. Rozklad NBD-gly je ovšem pozorovatelný pouze při laboratorní teplotě až po dosažení určité koncentrace tohoto derivátu a po razantním snížení koncentrace derivatizačního činidla (NBD-Cl) v důsledku jeho hydrolýzy. Na pokračující derivatizační reakci má zásadní vliv teplota. Světlo patrně významně přispívá spíše k rozkladné reakci NBD-gly.

## **6. Závěr**

Ve své diplomové práci jsem zjistila, že vzorky připravené derivatizací podle postupu aplikovaného na katedře farmakologie 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze nelze ani krátkodobě skladovat za podmínek, které jsem v této práci studovala. V počátečních dnech skladování vždy dochází k významnému nárůstu koncentrace NBD-gly v důsledku pokračující derivatizační reakce. Pokračující derivatizace byla u vzorků skladovaných za tmy a za nízké teploty (cca 2 °C) pozorována po celou dobu skladování, tj. 56 dní. U vzorků skladovaných při laboratorní teplotě docházelo k nárůstu koncentrace NBD-gly během prvních sedmi dnů, poté převládla rozkladná reakce. Světlo mělo urychlující vliv na tuto rozkladnou reakci.

Domnívám se, že hlavní příčinou této skutečnosti je nedodržení derivatizačního postupu uvedeného v literatuře (15, 16), kdy je pro ukončení derivatizační reakce nutný přídavek kyseliny chlorovodíkové, která znemožní další pokračování aromatické nukleofilní substituce. Pracoviště, pro něž bylo toto sledování prováděno, bylo již o těchto závěrech informováno.



## Použitá literatura

1. Soukupová M., Kubíček V., Janovský M.: Determination of Micromolar Concentrations of Neurotransmitter Amino Acid Glycine by Fluorescence Detection in Rat Microdialysis Perfusates. 57. Farmakologické dny 12. – 14. 9. 2007, Olomouc, Česká republika.
2. Lüllman H., Mohr K., Hein L.: Barevný atlas farmakologie, Grada, Praha 2007, str. 196.
3. Rokyta R., Kršiak M., Kozák J.: Bolest, Tigis, Praha 2006, str. 103, 105.
4. Ghosh P. B., Whitehouse M. W.: Biochem. J. 108 (1968), 155-156.
5. El-Elmam Ali A., Hansen S. H., Moustafa M. A., El-Ashry S. M., El-Sherbiny D. T.: J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004), 35-44.
6. Lunn. G., Hellwig L. C.: Handbook of Derivatization for HPLC, Wiley-Interscience, 1998, str. 248-250.
7. Sessa W. C., Rodgers R. L.: J. Chromatography B 382 (1986), 264-269.
8. Panchartek J., Štěrbá V., Večeřa M.: Reakční mechanismy v organické chemii, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1981, str. 194, 198, 199.
9. Hrabálek A. a kolektiv: Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2002, str. 3, 18, 19.
10. Svárovská H.: Diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2008.
11. Karlíček R. a kolektiv: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2009, str. 267, 277, 281.
12. Klimeš J. a kolektiv: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2008, str. 22, 23, 29-31.
13. Mikeš O. (ed.): Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods, Ellis Horwood Ltd., Chichester 1979, str. 254-278.
14. Churáček J., Jandera P.: Separace látek. Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie, skripta VŠCHT Pardubice, SNTL, Praha 1981, str. 66-71.
15. Bartos J., Pesez M.: Talanta 19 (1972), 93-124.
16. Sun Ch., Yang J., Li L., Wu X., Liu Y., Liu S.: J. Chromatography B 803 (2004), 173-190.